

PCT/JP 2004/005983

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

26. 4. 2004

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日            2 0 0 3 年   7 月 1 8 日  
Date of Application:

出 願 番 号            特 願 2 0 0 3 - 2 7 6 8 3 1  
Application Number:  
[ST. 10/C] :            [ J P 2 0 0 3 - 2 7 6 8 3 1 ]

REC'D 0 1 JUL 2004	
WIPO	PCT

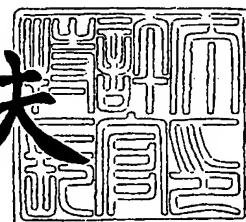
出 願 人            積水化学工業株式会社  
Applicant(s):

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2 0 0 4 年   6 月   4 日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

今 井 康 夫



出証番号   出証特 2 0 0 4 - 3 0 4 8 1 7 5

【書類名】 特許願  
【整理番号】 03P00984  
【提出日】 平成15年 7月18日  
【あて先】 特許庁長官殿  
【国際特許分類】 C07G 17/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内  
    【氏名】 北原 慎一郎  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内  
    【氏名】 新村 和夫  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内  
    【氏名】 阿部 佳子  
【発明者】  
    【住所又は居所】 大阪府三島郡島本町百山 2 - 1 積水化学工業株式会社内  
    【氏名】 栗山 澄  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000002174  
    【氏名又は名称】 積水化学工業株式会社  
    【代表者】 大久保 尚武  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003-124344  
    【出願日】 平成15年 4月28日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 005083  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】特許請求の範囲****【請求項 1】**

溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むことを特徴とするサイトカイン誘導材料。

**【請求項 2】**

溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、誘導増強剤に固定化されていることを特徴とする請求項 1 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 3】**

溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、物理吸着で誘導増強剤に固定化されていることを特徴とする請求項 2 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 4】**

溶連菌及び／又は溶連菌由来成分が物理吸着で誘導増強剤に固定化される際において、ホルマリンを含有する溶液中で前記誘導増強剤に固定化されることを特徴とする請求項 3 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 5】**

誘導増強剤は、高分子材料からなることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 6】**

誘導増強剤を構成する高分子材料は、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系及びセルロース系の各高分子材料からなる群から選択される少なくとも 1 種であることを特徴とする請求項 5 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 7】**

誘導増強剤は、炭素材料からなることを特徴とする請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 8】**

誘導増強剤を構成する炭素材料は、活性炭であることを特徴とする請求項 7 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 9】**

誘導増強剤を構成する炭素材料は、粒径が 50 超～2000  $\mu\text{m}$  である球状の活性炭であることを特徴とする請求項 8 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 10】**

誘導増強剤を構成する炭素材料は、長軸径が 50 超～4000  $\mu\text{m}$  以下であり、短軸径が 50 超～2000  $\mu\text{m}$  である非球状の活性炭であることを特徴とする請求項 8 に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 11】**

誘導増強剤を構成する炭素材料は、石油ピッチ、フェノール樹脂、石炭及びヤシガラからなる群から選択される少なくとも 1 種から得られた活性炭であることを特徴とする請求項 8～10 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 12】**

誘導増強剤は、中心線平均粗さ  $R_a$  値が 0.2～10  $\mu\text{m}$  である表面を有することを特徴とする請求項 1～11 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 13】**

誘導されるサイトカインが、インターフェロン $\gamma$ 、インターロイキン 2、インターロイキン 10、インターロイキン 12、腫瘍壊死因子 $\alpha$ 、及び、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  からなる群から選択される少なくとも 1 種のサイトカインであることを特徴とする請求項 1～12 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導材料。

**【請求項 14】**

容器と、容器内に収納された請求項 1～13 のいずれか 1 項に記載のサイトカイン誘導材料とを有することを特徴とするサイトカイン誘導用具。

【請求項 1 5】

容器内に収納されたサイトカイン誘導材料は、血液又は血液成分と接触することを特徴とする請求項 1 4 記載のサイトカイン誘導用具。

## 【書類名】明細書

【発明の名称】サイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具

## 【技術分野】

【0001】

本発明は、サイトカイン誘導療法等に用いられ、効果的にサイトカインを誘導し得るサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具に関する。

## 【背景技術】

【0002】

サイトカインは、多種多様な細胞間情報伝達因子の総称である。サイトカインとしては、例えば、インターフェロン $\alpha$ 、インターフェロン $\beta$ 、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン1~インターロイキン27、腫瘍壊死因子 $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor- $\alpha$ 、TNF- $\alpha$ )、腫瘍壊死因子 $\beta$  (Tumor Necrosis Factor- $\beta$ )、トランスフォーミング増殖因子 $\alpha$  (Transforming Growth Factor- $\alpha$ )、トランスフォーミング増殖因子 $\beta$  (Transforming Growth Factor- $\beta$ 、TGF- $\beta$ )、各種細胞増殖因子等が挙げられる(非特許文献1、非特許文献2、非特許文献3)。

【0003】

サイトカインは生体内で様々な活性を有し、様々な疾患に関与していることが知られている。このようなサイトカインの活性を生体内で惹起して疾患の治療を行う、サイトカイン誘導療法が従来より行われている。サイトカイン誘導療法では、患者に、サイトカイン誘導剤を投与し、生体内においてサイトカインの誘導を引き起こす。このようなサイトカイン誘導療法に用いられるサイトカイン誘導物質としては、様々な物質が知られている。例えば、微生物由来のサイトカイン誘導物質としては、OK-432、BCG、ベスタチン、丸山ワクチン、ロムリチド等が知られており、担子菌類由来のサイトカイン誘導物質としては、クレスチン、レンチナン、シゾフィラン等が知られている。

【0004】

例えば、OK-432やBCG等は血液等からインターロイキン1やインターフェロン $\gamma$ 等のサイトカインを誘導することが知られている(非特許文献4、非特許文献5)。

【0005】

しかしながら、上述したサイトカイン誘導療法では、生体内でサイトカインを誘導することはできるが、充分量のサイトカインを誘導することが困難であり、強い効力を発揮させ難いという問題があった。また、サイトカインを効果的に誘導するために、サイトカイン誘導剤の投与量が多くなり、副作用が大きくなり、治療を有効に行い得ないという問題もあった。

【0006】

一方、下記特許文献1にはインターロイキン1、OK-432、遺伝子組み換えインターロイキン2、又は、 $\gamma$ -インターフェロンを不溶性担体に共有結合で結合してなる癌治療用白血球刺激材が示されているが、これらは腫瘍障害性細胞を誘導するものであり、これらの先行技術ではサイトカイン誘導については全く述べられていない。また、この先行技術では、不溶性担体は、上記の4種類の物質を固定化するためにだけ用いられているものであり、本発明のような効果の増強については全く述べられていない。

【0007】

【非特許文献1】臨床免疫第27巻特別増刊号1995年「サイトカインのすべて」科学評論社

【非特許文献2】臨床免疫第36巻、39-44、2001年

【非特許文献3】臨床免疫第39巻、189-200、2003年

【非特許文献4】岐阜大医紀43:166-177、1995年

【非特許文献5】Molecular medicine Vol. 36、臨時増刊号、220-229、1999年

【特許文献1】特開昭61-277628号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0008】

本発明は、上記現状に鑑み、従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具を提供することを目的とする。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0009】

本発明は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むサイトカイン誘導材料である。

本願発明者らは、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分とともに水に不溶性の誘導増強剤を含むサイトカイン誘導材料、又は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分が固定化された水に不溶性の誘導増強剤からなるサイトカイン誘導材料が、著しく高いサイトカイン誘導量を示すことを見だし、本発明を完成した。

## 【0010】

以下に本発明を詳述する。

本発明のサイトカイン誘導材料は、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含む。

## 【0011】

上記誘導増強剤としては特に限定されず、水に不溶性であればよい。誘導増強剤を構成する材料としては、例えば、無機物材料、有機物材料、金属等が挙げられ、好ましくは無機物材料及び有機物材料であり、また、無機物材料の中では炭素材料が好ましく、有機物材料の中では高分子材料が好ましく、さらに、これらの中でも活性炭が好ましい。

## 【0012】

上記無機物材料としては、例えば、活性炭などの炭素材料、ガラス若しくはガラスの誘導体、シリカ系組成物、アルミナ、ヒドロキシアパタイト等が挙げられる。中でも、炭素材料が好ましく、さらに、炭素材料の中でも活性炭が好ましい。

## 【0013】

上記炭素材料は、従来公知の任意の方法により、有機化合物を焼成して得られた炭化物である。また、活性炭は、上記炭化物を賦活化させ、多孔性としたものである。賦活化の方法としては特に限定されず、従来公知の任意の方法が採用できる。例えば、高温水蒸気により賦活化させる方法、薬品により賦活化させる方法等が挙げられる。尚、賦活化は、比表面積が  $800 \text{ m}^2/\text{g}$  以上になるように行うのが好ましい。

## 【0014】

上記炭素材料の原材料となる有機化合物としては特に限定されず、その中でも活性炭の原材料としては、例えば、石油ピッチ、石炭、木材、ヤシガラ、おがくずなどの他、フェノール樹脂、塩化ビニル樹脂、アクリル樹脂、塩化ビニルデン樹脂などの合成樹脂等が挙げられ、中でも、石油ピッチ、石炭、ヤシガラ及びフェノール樹脂が好ましく、より好ましくは、石油ピッチ及びフェノール樹脂である。

## 【0015】

上記活性炭は、球状或いは非球状の種々の形状のものがああり、その形状は特に限定されない。尚、非球状としては、例えば、ペレット状、円柱状、円筒状、破碎状、繊維状等が挙げられる。また、上記活性炭は、必要に応じて、ポリヒドロキシエチルメタクリレートなどの非水溶性高分子材料によりコーティングされていてもよい。

## 【0016】

上記活性炭が球状の場合、その粒径は、 $50 \mu\text{m}$  以下になるとサイトカイン誘導増強効果が低下するので、下限が  $50 \mu\text{m}$  超であるのが好ましく、また、上限が  $10000 \mu\text{m}$  であるのが好ましく、より好ましくは上限が  $2000 \mu\text{m}$  である。尚、球状とは完全な球状である必要はなく、完全な球状でない場合には、活性炭が接して収まる球を想定し、その球の直径を活性炭の粒径とする。

## 【0017】

上記活性炭が繊維状以外の非球状の場合、その長軸径及び短軸径は、 $50\mu\text{m}$ 以下になるとサイトカイン誘導増強効果が低下するので、長軸径は、下限が $50\mu\text{m}$ 超であるのが好ましく、また、上限が $10000\mu\text{m}$ であるのが好ましく、より好ましくは上限が $4000\mu\text{m}$ であり、短軸径は、下限が $50\mu\text{m}$ 超であるのが好ましく、また、上限が $10000\mu\text{m}$ であるのが好ましく、より好ましくは上限が $2000\mu\text{m}$ である。尚、非球状の活性炭の長軸径及び短軸径は、非球状の活性炭の幅が最も大きい方向を高さ方向として、活性炭が接して収まる円柱を想定し、その円柱の高さを長軸径、底面の円の直径を短軸径とする。また、長軸径と短軸径とは同一の値となってもよい。

## 【0018】

本発明でいう粒径、長軸径及び短軸径は、電子顕微鏡などで拡大し、実際に測定を行ってもよいが、以下のふるい分け方法により、本発明でいう粒径、短軸径及び長軸径が上記範囲である活性炭を得ることができる。

まず、ふるいの目開きの最大径が、 $50\mu\text{m}$ 、 $2000\mu\text{m}$ 、 $4000\mu\text{m}$ 、 $10000\mu\text{m}$ である、内径 $200\text{mm}$ のステンレス製のふるいを用意する。一方、径を測定しようとする活性炭から $10\sim100\text{g}$ を試料として採取する。その際、活性炭が吸湿により凝集している試料については、試料の本質を損なわない条件で乾燥させる。

次に、目開きの最大径が $50\mu\text{m}$ のふるいの上に、目開きの最大径が $2000\mu\text{m}$ のふるいを積み重ね、その上に目開きの最大径が $4000\mu\text{m}$ であるふるいを積み重ね、さらにその上に目開きの最大径が $10000\mu\text{m}$ であるふるいを積み重ねる。その後、最上部の目開きの最大径が $10000\mu\text{m}$ のふるいの上に上記試料を投入し、積み重ねたふるいを一体にして5分間ふるいを行う。

ふるいを行った後、以下の通り、ふるい上の残分を収集する。活性炭が球状である場合は、最大目開きが $50\mu\text{m}$ のふるい上の残分が、粒径が下限 $50\mu\text{m}$ 超、上限 $2000\mu\text{m}$ のものであり、最大目開きが $50\mu\text{m}$ 、 $2000\mu\text{m}$ 及び $4000\mu\text{m}$ のふるい上の残分を合わせたものが、粒径が下限 $50\mu\text{m}$ 超で上限 $10000\mu\text{m}$ のものである。活性炭が非球状である場合は、最大目開きが $50\mu\text{m}$ のふるい上の残分が、長軸径の下限 $50\mu\text{m}$ 超、上限 $4000\mu\text{m}$ であるとともに、短軸径の下限 $50\mu\text{m}$ 超、上限 $2000\mu\text{m}$ のものであり、最大目開きが $50\mu\text{m}$ 、 $2000\mu\text{m}$ 及び $4000\mu\text{m}$ のふるい上の残分を合わせたものが、長軸径の下限 $50\mu\text{m}$ 超、上限 $10000\mu\text{m}$ であるとともに、短軸径の下限 $50\mu\text{m}$ 超、上限 $10000\mu\text{m}$ のものである。尚、上記のふるい分け方法によっても、上記粒径、長軸径及び短軸径以外の径のものも混入する恐れがあるが、それが実質的に無視できる量であれば混入していても差し支えない。

## 【0019】

また、上記活性炭は繊維状であってもよい。その場合、活性炭は、布状、網状、シート状、中空糸状等の公知の形状のものを用いることができる。

## 【0020】

上記高分子材料としては、例えば、セルロース系、アガロース系、デキストラン系、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエチレンテレフタレート系などのポリエステル系、ナイロン系などのポリアミド系、ポリビニルアルコール系、ポリスルホン系、ポリアクリロニトリル系、ポリウレタン系、ポリエチレン系、ポリプロピレン系等の材料が挙げられ、中でも、セルロース系、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系及びポリビニルアルコール系のものが好ましく、より好ましくはポリスチレン系のものである。

## 【0021】

上記ポリスチレン系の高分子材料としては、例えば、ジビニルベンゼン-スチレン共重合体等が挙げられ、上記アクリルエステル系の高分子材料としては、例えば、ポリメチルメタクリレート、ポリヒドロキシエチルメタクリレート等が挙げられる。

## 【0022】

上記誘導増強剤が高分子材料からなる場合、その大きさは、粒子状である場合は、粒径

が下限は  $50\ \mu\text{m}$ 、上限は  $2000\ \mu\text{m}$  であるのが好ましい。また、繊維状である場合は、繊維径が  $10\ \mu\text{m}$  以下であることが好ましく、 $5\ \mu\text{m}$  以下であることがより好ましい。さらに、上記誘導増強剤が繊維状の高分子材料からなる場合は不織布であることが好ましいが、不織布である場合、繊維径は  $3\ \mu\text{m}$  以下であることが好ましい。

#### 【0023】

上記金属としては、例えば、金若しくは金合金、銀若しくは銀合金、チタン若しくはチタン合金、ステンレス等が挙げられる。

#### 【0024】

さらに、上記誘導増強剤は、白血球を吸着する材料からなることが好ましい。白血球を吸着する材料としては、無機物材料の中では、例えば、活性炭などの炭素材料、ガラス若しくはガラスの誘導体等が挙げられ、有機物材料の中では、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、ポリビニルアルコール系、酢酸セルロースなどのセルロース系等の高分子材料が挙げられ、中でも、活性炭及びポリスチレン系高分子材料が好ましく、より好ましくは活性炭である。

#### 【0025】

上記誘導増強剤は無極性であり、疎水性であっても親水性であってもよい。疎水性である場合、活性炭又はポリスチレン系高分子材料からなるのが好ましく、活性炭からなるのがより好ましい。また、これら誘導増強剤に表面修飾や表面コーティング等を行うことで、表面に親水性を付与することができる。

#### 【0026】

上記誘導増強剤の形状としては特に限定されず、例えば、粒子状、繊維状、不織布状、スポンジ状、膜状、シート状、中空糸状等の公知の形状を用いることができ、中でも粒子状及び繊維状が好ましい。

#### 【0027】

上記誘導増強剤は、表面粗さが付与されたものであることが好ましく、その中心線平均粗さ  $R_a$  値は、下限が  $0.2\ \mu\text{m}$ 、上限が  $10\ \mu\text{m}$  であることが好ましい。

上記誘導増強剤の表面に  $R_a$  値が  $0.2\ \mu\text{m}$  以上の粗さを付与することにより、著しくサイトカインの誘導が増強される。また、この表面粗さのサイトカイン誘導増強作用は、白血球の大きさが  $10\sim20\ \mu\text{m}$  であることを考えると、白血球に比べて上記  $R_a$  値が非常に小さいことから、単なる接触表面積の増大によるものでないと考えられる。

ここで、上記  $R_a$  値とは JIS B0601-1982 における中心線平均粗さである。

#### 【0028】

さらに、上記誘導増強剤は、凸凹を表面に有することが好ましく、その凸凹平均間隔  $S_m$  値は、下限が  $5\ \mu\text{m}$ 、上限が  $200\ \mu\text{m}$  であることが好ましい。

ここで、上記凸凹平均間隔  $S_m$  値は、以下のようにして定義される値である。

まず、図1に示す粗さ曲線Aの中心線Bに対して、それぞれ、一定の高さ及び深さの位置に上側カウントレベルC及び下側カウントレベルDを引く。次に、下側のカウントレベルDと粗さ曲線Aとが交差する2点間において、上側カウントレベルと粗さ曲線とが交差する点が一回以上存在するときに、一つの山として「山」を定義する。

そして、凸凹平均間隔  $S_m$  値は、図2に示すように、基準長さ  $L$  の間にある山の間隔を  $S_{mi}$  としたときに、下記の式(1)で定義される値である。

#### 【0029】

##### 【数1】

$$S_m = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n S_{mi} \quad (n: \text{山数}) \quad \dots (1)$$



## 【0030】

すなわち、凸凹平均間隔 $S_m$ 値とは、基準長さ $L$ の間にある山同士の間隔の平均値を示す。このようにして、凸凹平均間隔 $S_m$ の値により、凸凹の面方向の条件が定義される。

## 【0031】

現在のJIS規格では、表面粗さの高さ方向の情報については規定されているが、面方向の情報に関しては規定されていない。しかしながら、本発明における誘導増強剤の表面粗さは、凸凹の面方向における間隔によっても特徴付けられるものである。

## 【0032】

上記誘導増強剤の表面粗さは、構成材料の多孔性等に由来するものであるのが好ましい。上記誘導増強剤に用いられる多孔性の構成材料としては活性炭が好ましく、その他にも、例えば、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系等の高分子材料が挙げられるが、好ましくは活性炭である。

## 【0033】

また、上記誘導増強剤の表面粗さは、構成材料が繊維状材料である場合の繊維形状に由来するものであっても良く、その場合、上記誘導増強剤は、繊維状材料からなる不織布状であるのが好ましい。上記繊維状材料としては、例えば、活性炭などの炭素材料の他、ポリスチレン系、アクリルエステル系、ポリエステル系、ナイロン系、セルロース系、ポリビニルアルコール系等の高分子材料からなるものが挙げられるが、好ましくは活性炭及びポリスチレン系高分子材料であり、より好ましくは活性炭である。

## 【0034】

上記溶連菌は、溶血性連鎖球菌に属する菌であり、好ましくはA群 $\beta$ 溶血性を示す化膿性連鎖球菌であり、より好ましくは、ストレプトコックス・ピオゲネスに属する菌である。例えば、ストレプトコックス・ピオゲネス（A群3型）Su株ペニシリン処理凍結乾燥粉末からなる菌体成分であるOK-432等が挙げられる（特開昭49-48822号公報）。

また、上記溶連菌由来成分としては、モノクローナル抗体をCNBr活性化セファロースに結合させた粒子をカラム担体としてアフィニティークロマトグラフ法により抽出・精製したOK-432由来成分であるOK-PSA（J. Immunother. 2000、Jan; 23（1）、94-103）や、溶連菌をメタノール、エタノール、アセトン、酢酸エチル、ジエチルエーテル、ジクロロメタン、クロロホルム等の有機溶媒に接触させて得られる有機溶媒への可溶性成分、その不溶性成分等が挙げられる。また、溶連菌を水、生理食塩水、リンや、カリウム、マグネシウム、カルシウムなどの無機塩が溶解した水溶液等に接触させて得られる水溶液への可溶性成分、又は、その不溶性成分等も本発明における溶連菌由来成分に含まれる。

## 【0035】

また、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分のみではサイトカイン誘導能を充分に発揮し得ないものであっても、上記水に不溶性の誘導増強剤と組み合わせて用いることにより、サイトカイン誘導活性を発揮させることもできる。

## 【0036】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、上記誘導増強剤の表面に固定化するのが好ましい。固定化は、物理吸着、共有結合、イオン結合等の公知の方法を用いることができるが、固定化方法の簡便さから物理吸着が好ましい。また、共有結合等の場合には必要に応じて、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、誘導増強剤との結合部に任意の長さをもつスペーサーを導入することもできる。

## 【0037】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、必要に応じて、固定化する前に菌体の洗浄操作や破碎操作、成分分画操作等のさまざまな前処理が施されてもよい。また、OK-432は増殖能を有さない生菌であるが、より安全性を高めるために、必要に応じて、固定化する前、固定化と同時、又は、固定化の後のいずれの時点でも、加熱処理、薬品処理、放

射線処理、ガス滅菌処理等のさまざまな方法により死菌化してもよい。上記加熱処理としては、例えば、オートクレーブ処理等が挙げられ、上記薬品処理としては、例えば、グルタルアルデヒド処理、ホルマリン処理、エタノール処理等が挙げられ、上記放射線処理としては、例えば、 $\gamma$ 線処理等が挙げられ、上記ガス滅菌処理としては、エチレンオキシドガス処理等が挙げられる。これらの処理のうち、薬品処理であるホルマリン処理が、従来より消毒液等として使われており、安全で、かつ、菌体自身を極めて安定化するため好ましい。

#### 【0038】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を上記誘導増強剤に固定化する場合には、菌体表面外壁成分のアミノ酸や糖成分等を介して、上記誘導増強剤のカルボキシル基、アミノ基及び／又はエポキシ基等の官能基に結合してもよい。この際、必要に応じてさまざまな鎖長や構造のスペーサーを導入することもできる。

#### 【0039】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分を、上述した前処理により、その表面が電荷を帯びている状態にした場合には、その対極電荷を表面に有する誘導増強剤にイオン結合作用によって固定化することもできる。

#### 【0040】

上記誘導増強剤の使用割合としては特に限定されないが、粒子状の誘導増強剤として用いる場合には、血液容積に対する誘導増強剤のかさ体積量として、下限は0.02%が好ましく、より好ましい下限は0.1%であり、上限は80%が好ましく、より好ましい上限は50%である。

#### 【0041】

上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分の使用割合としては特に限定されないが、例えば、OK-432を用いる場合は、血液に添加される濃度として、下限は0.0001KE/mLが好ましく、上限は10KE/mLが好ましい。

#### 【0042】

本発明のサイトカイン誘導材料を容器内に収容することによりサイトカイン誘導用具を作成することができる。容器と、容器内に収納された本発明のサイトカイン誘導材料とを有するサイトカイン誘導用具もまた、本発明の1つである。

#### 【0043】

本発明のサイトカイン誘導用具では、上記誘導増強剤と溶連菌及び／又は溶連菌由来成分とを含むサイトカイン誘導材料が、容器内にて血液又は血液成分等と接触し、それによって血液又は血液成分等の中でサイトカインが効果的に誘導される。この場合、接触温度を下限は15℃、上限は42℃の範囲とすることが好ましく、それによって、サイトカインの誘導をより効果的に引き起こすことができる。

#### 【0044】

なお、上記誘導増強剤、並びに、上記溶連菌及び／又は溶連菌由来成分は、予め混合された状態で血液若しくは血液成分等と接触してもよく、又は、いずれかを先に血液若しくは血液成分等と接触させた系に、他方を接触させてもよい。

また、本発明のサイトカイン誘導用具では、サイトカイン誘導材料を収納する容器の構造は特に限定されないが、図3に模式的に示すように、血液等の導入部1と、サイトカイン誘導材料と接触した血液4等を容器外に導く導出部2とが備えられている容器3が好ましい。

上記容器としては、カラム状の容器や血液バッグ状の容器等がより好ましい。

#### 【0045】

本発明のサイトカイン誘導用具には、サイトカイン誘導材料と接触させた血液等を容器外に導く場合に、サイトカイン誘導材料が血液に混入しないような、サイトカイン誘導材料流出防止機構が備えられていることが好ましい。

#### 【0046】

図3に模式的に示すように、サイトカイン誘導材料流出防止機構5は、サイトカイン誘

導材料があらかじめ脱離しないように、収納容器内部に固定化されていても良く、このような場合のサイトカイン誘導材料流出防止機構としては、例えば、流出防止用の分離膜や分離フィルター等が挙げられる。また、その他のサイトカイン誘導材料流出防止機構としては、例えば、遠心操作等によって血液と分離する機構等が挙げられる。

#### 【0047】

必要によっては、サイトカイン誘導材料と接触させた血液等から血漿や血清成分等を分離して治療等に用いてもよい。

本発明のサイトカイン誘導用具の1実施態様としては、例えば、導入部と導出部を有する血液バッグに粒子状、繊維状、不織布状等の誘導増強剤を含む本発明のサイトカイン誘導材料を充填し、ここに血液又は血液成分等を導入する。必要に応じて、サイトカインを誘導した血液又は血液成分等を導出部から取り出し利用することができる。これらの血液バッグの容量としては下限は50mLが好ましく、より好ましい下限は100mLであり、上限は1000mLであることが好ましく、より好ましい上限は400mLである。これらの血液バッグは粒子状、繊維状、不織布状等の本発明のサイトカイン誘導材料を収納することが好ましい。

#### 【0048】

本発明のサイトカイン誘導材料又はサイトカイン誘導用具により誘導されるサイトカインとしては特に限定されないが、中でも、インターフェロン $\gamma$  (IFN- $\gamma$ )、インターロイキン2 (IL-2)、インターロイキン10 (IL-10)、インターロイキン12 (IL-12)、腫瘍壊死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、トランスフォーミング増殖因子- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) 等が好適に挙げられる。例えば、IFN- $\gamma$  はリウマチ等の免疫疾患、炎症性疾患、アレルギー性疾患、癌等のさまざまな疾患において非常に重要な役割を担っているサイトカインであり、IFN- $\gamma$  を誘導することによりこれらの疾患に対する治療効果が期待できる。

#### 【0049】

本発明のサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具は、血液又は血液成分等に限らず、骨髓系細胞、表皮細胞、繊維芽細胞、肝細胞、骨芽細胞、血液幹細胞、胚性幹細胞等の組織から採取した細胞や培養細胞、株化細胞等、サイトカインを産生する様々な細胞からもサイトカインを誘導することができる。

#### 【発明の効果】

#### 【0050】

本発明は、上述の構成よりなるので、本発明のサイトカイン誘導材料を、例えば、血液又は血液成分と接触させることにより、従来のサイトカイン誘導剤に比べて、サイトカインをより効果的に誘導することができるので、本発明のサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具は、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に好適に用いることができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

#### 【0051】

以下、実施例を挙げて本発明をより詳しく説明する。なお、本発明は以下の実施例に限定されるものではない。

尚、ヒト及びラット血漿中のIFN- $\gamma$ 、IL-10の測定は、R&D Systems社製ELISAキット、ENDOGEN社製ELISAキット、又は、ジェンザイム・テクネ社製ELISAキットにて行なった。

また、用いた健常人の血液の採血直後及び実施例1と同様に血液のみを培養した後において、血漿中IFN- $\gamma$ の値は全て10pg/mL以下であった。同様に、健常人の血液の採血直後及び実施例1と同様に血液のみを培養した後において、血漿中IL-10の値は全て10pg/mLであった。同様に、用いたラットの血液の採血直後及び実施例1と同様に血液のみを培養した後において、血漿中IFN- $\gamma$ の値は全て40pg/mL以下であった。

#### 【実施例】

## 【0052】

## (実施例1)

誘導増強剤1 (粒子状ポリスチレン系高分子材料、三菱化学社製、商品名: ダイアイオンHP-50) をメタノール (和光純薬社製、HPLC用) にてデカンテーションにより洗浄し、しかる後精製水 (大塚製薬社製) にてデカンテーションすることにより洗浄した。次に、注射用生理食塩水 (大塚製薬社製) にて誘導増強剤1 をデカンテーションにより洗浄し、粒子かさ体積で20  $\mu$ L の誘導増強剤1 を滅菌済みチューブ (ダイヤアトロン社製、エッペンドルフチューブ1.5 mL用) に充填した。

## 【0053】

また、健常人から採血し、ヘパリン15 IU/mL 含有静脈血を得た。その後、OK-432 (中外製薬社製、商品名: ピシバニール) を、0.1 KE/mL の濃度となるように各血液に添加した。尚、OK-432 は、生理食塩水で調製されたものであり、生理食塩水が血液に対して1%となるように調製した。OK-432 が添加された血液を、誘導増強剤1 がかさ体積で20  $\mu$ L 充填された上記チューブに、チューブの目盛りが1.5 mLとなるように添加した。すなわち、血液を1.48 mL 添加した。

## 【0054】

次に、チューブを転倒混和して血液を攪拌し、ロータリーミキサー (TAITEC社製) に取り付け、6 rpm で転倒混和させつつ、37℃にて24時間恒温槽中でインキュベートした。インキュベート後の血液を4℃で3500 rpm (トミー精工社製、微量高速遠心機MRX-150) で15分間遠心し、しかる後血漿を採取し、-20℃で該血漿を凍結保存した。しかる後、保存された血漿を、融解し、Human IFN- $\gamma$  ELISA キット (R&D System社製又はENDOGEN社製) にて血漿中のIFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表1に示した。

## 【0055】

## (実施例2、3)

誘導増強剤1 のかさ体積を表1に示した所定量とし、かつ、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を (1.5 mL - 誘導増強剤1 のかさ体積) としたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表1に示した。

## 【0056】

## (比較例1)

誘導増強剤1 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を1.5 mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表1に示した。

## 【0057】

## (比較例2~4)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例1~3と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表1に示した。

## 【0058】

## 【表1】

	誘導増強剤1 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例1	20	0.1	360
実施例2	50	0.1	367
実施例3	100	0.1	323
比較例1	—	0.1	114
比較例2	20	—	<10
比較例3	50	—	<10
比較例4	100	—	<10

## 【0059】

(実施例 4)

誘導増強剤 1 に替えて、誘導増強剤 2 (粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、商品名: アンバーライト XAD-2000) を用いたことを除いては、実施例 2 と同様に、血漿中の IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0060】

(実施例 5)

誘導増強剤 2 のかさ体積を 100  $\mu$ L としたこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.4 mL としたことを除いては、実施例 4 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0061】

(比較例 5)

誘導増強剤 2 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 4 と同様に、IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0062】

(比較例 6、7)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 4、5 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 2 に示した。

## 【0063】

【表 2】

	誘導増強剤 2 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 4	50	0.1	251
実施例 5	100	0.1	236
比較例 5	—	0.1	117
比較例 6	50	—	<10
比較例 7	100	—	<10

## 【0064】

次に、ラット血液におけるサイトカイン誘導について実施例 6、7 及び比較例 8~10 において検討した。

(実施例 6)

実施例 2 と同様に、かさ体積 50  $\mu$ L の誘導増強剤 1 を充填した滅菌済みチューブを得た。

ウィスターラット (7 週齢、雄、日本 SLC 社より購入) よりヘパリン 15 IU/mL 含有静脈血を採取した。この血液に、0.1 KE/mL 濃度となるように、OK-432 (中外製薬社製、商品名: ピシバニール) を添加した。なお、OK-432 は RPMI 培地で調製されたものであり、RPMI 培地が血液に対して 20% となるように調製した。OK-432 が添加された血液を上記誘導増強剤 1 が充填されたチューブに、目盛りが 1.5 mL となるように添加した。

## 【0065】

以下、実施例 2 と同様に血漿を採取し、ラット IFN- $\gamma$  定量キット (ジェンザイム・テクネ社製) を用いて IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0066】

(実施例 7)

誘導増強剤 1 のかさ体積を 500  $\mu$ L としたこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.0 mL としたことを除いては、実施例 6 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0067】

## (比較例 8)

誘導増強剤 1 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 6 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0068】

## (比較例 9、10)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 6、7 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 3 に示した。

## 【0069】

## 【表 3】

	誘導増強剤 1 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 の濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 6	50	0.1	251
実施例 7	500	0.1	435
比較例 8	—	0.1	72
比較例 9	50	—	<40
比較例 10	500	—	<40

## 【0070】

## (実施例 8～13)

誘導増強剤 3 として、CA フィルム（酢酸セルロースフィルム、アートプラス社製、商品名：アセチフィルム VR-R）を用い、フィルム表面をメチルアルコールで 24 時間、ソックスレー抽出を行って可塑剤を抽出し、フィルムを取り出した後、15 時間風乾後、更に 80℃ で 5 時間乾燥した。その後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、4000、2400、1200、500、又は、220 メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、上記 CA フィルムを研磨し、両側の表面に表 4 に示した所定の表面粗さを持つ研磨済み CA フィルムを作製した。このフィルムをメチルアルコールで洗浄後、2.5 mm × 2.5 mm の大きさに細片化し、かさ体積で約 200  $\mu$ L となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5 mL 用滅菌済みチューブに充填した。尚、実施例 8 については未研磨の CA フィルムを使用した。

また、健常人から採血し、ヘパリン 15 IU/mL 含有静脈血を得た。その後、OK-432（中外製薬社製、商品名：ピシバニール）を、0.1 KE/mL の濃度となるように血液に添加した。尚、OK-432 は、実施例 1 と同様に生理食塩水で調整されたものである。OK-432 が添加された血液を、誘導増強剤 3 がかさ体積で 200  $\mu$ L 充填された上記チューブに、チューブの目盛りが 1.5 mL となるように添加した。すなわち、血液を 1.3 mL 添加した。

しかる後、実施例 1 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

## 【0071】

## (比較例 11～16)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 8～13 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 4 に示した。

## 【0072】

【表4】

	実施例					
	8	9	10	11	12	13
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.05	0.05	0.06	0.58	1.28	2.37
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	250	125	31	30	44	57
OK-432 濃度 (KE/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	48	80	87	174	201	194

	比較例					
	11	12	13	14	15	16
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.05	0.05	0.06	0.58	1.28	2.37
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	250	125	31	30	44	57
OK-432 濃度 (KE/mL)	—	—	—	—	—	—
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

## 【0073】

(実施例14～19)

誘導増強剤4として、PETフィルム（ポリエチレンテレフタレートフィルム、ユニチカ社製、商品名：エンブレットS-75）を用い、フィルム表面をメチルアルコールで洗浄した。しかる後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、4000、2400、1200、500、又は、220メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、PETフィルムを研磨し、両側の表面に表5に示した所定の表面粗さを持つ研磨ずみPETフィルムを作製した。このフィルムをメチルアルコールで洗浄後、2.5mm×2.5mmの大きさに細片化し、かさ体積で約200 $\mu\text{L}$ となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5mL用滅菌済みチューブに充填した。尚、実施例14については未研磨のPETフィルムを使用した。

また、健常人から採血し、ヘパリン15IU/mL含有静脈血を得た。その後、OK-432（中外製薬社製、商品名：ピシバニール）を、0.1KE/mLの濃度となるように血液に添加した。尚、OK-432は、実施例1と同様に生理食塩水で調整されたものである。OK-432が添加された血液を、誘導増強剤4がかさ体積で200 $\mu\text{L}$ 充填された上記チューブに、チューブの目盛りが1.5mLとなるように添加した。すなわち、血液を1.3mL添加した。

しかる後、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

## 【0074】

(比較例17～22)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例14～19と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表5に示した。

## 【0075】

【表 5】

	実施例					
	14	15	16	17	18	19
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.07	0.12	0.19	0.61	1.55	2.24
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	475	37	126	31	47	77
OK-432 濃度 (KE/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	51	84	86	168	184	193

	比較例					
	17	18	19	20	21	22
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.07	0.12	0.19	0.61	1.55	2.24
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	475	37	126	31	47	77
OK-432 濃度 (KE/mL)	—	—	—	—	—	—
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

## 【0076】

(実施例 20～25)

誘導増強剤 5 として、ポリスチレンフィルム（三菱モンサント社製、商品名：サントクリア）を用い、フィルム表面を精製水で洗浄した。しかる後、ストルアス社（デンマーク）製自動研磨機（商品名：プラノボールペデマックス）に、4000、2400、1200、500、又は、220 メッシュのサンドペーパーを取り付けたものを用いて、ポリスチレンフィルムを研磨し、両側の表面に表 6 に示した所定の表面粗さを持つ研磨済みポリスチレンフィルムを作製した。このフィルムを精製水で洗浄後、2.5 mm×2.5 mm の大きさに細片化し、かさ体積で約 200  $\mu\text{L}$  となるようにはかり取った。これらの細片を注射用生理食塩水で洗浄後、1.5 mL 用滅菌済みチューブに充填した。尚、実施例 20 については未研磨のポリスチレンフィルムを使用した。

また、健常人から採血し、ヘパリン 15 IU/mL 含有静脈血を得た。その後、OK-432（中外製薬社製、商品名：ピシバニール）を、0.1 KE/mL の濃度となるように血液に添加した。尚、OK-432 は、実施例 1 と同様に生理食塩水で調整されたものである。OK-432 が添加された血液を、誘導増強剤 5 がかさ体積で 200  $\mu\text{L}$  充填された上記チューブに、チューブの目盛りが 1.5 mL となるように添加した。すなわち、血液を 1.3 mL 添加した。

しかる後、実施例 1 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 6 に示した。

## 【0077】

(比較例 23～28)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 20～25 と同様に、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 6 に示した。

## 【0078】



【表 6】

	実施例					
	20	21	22	23	24	25
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.06	0.08	0.21	0.72	1.75	2.44
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	375	52	43	27	39	71
OK-432 濃度 (KE/mL)	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	57	105	107	229	253	234

	比較例					
	23	24	25	26	27	28
	未研磨	研磨				
		4000 メッシュ	2400 メッシュ	1200 メッシュ	500 メッシュ	220 メッシュ
Ra 値 ( $\mu\text{m}$ )	0.06	0.08	0.21	0.72	1.75	2.44
Sm 値 ( $\mu\text{m}$ )	375	52	43	27	39	71
OK-432 濃度 (KE/mL)	—	—	—	—	—	—
IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

## 【0079】

(実施例 26)

酢酸セルロースペレット（アートプラス社製、可塑剤としてアセチルクエン酸トリエチル 30% 含有）を射出成形し、直径 2.5 mm の球状ビーズを作製した。このビーズ 50 g をメタノール 300 mL により、50℃で 24 時間ソックスレー抽出し、可塑剤を抽出した。しかる後、可塑剤が抽出されたビーズをステンレス製バットに取り出し、15 時間風乾した後、更に 80℃で 5 時間乾燥させた。

## 【0080】

ポットミル（東洋エンジニアリング社製、商品名：51-セラミックポットミル BP-5）に、上記ビーズ 200 mL 及び同容量の研磨剤として WHITE ABRAX (WA) #34（日本研磨材工業社製）を投入し、更にセラミックポットミル用ボール（東洋エンジニアリング社製、商品名：BB-13）数個を投入し、ボール研磨機（日陶科学社製ポットミル、商品名：AN-3S）により 5 時間研磨した。このようにして、Ra 値 1.36  $\mu\text{m}$  及び Sm 値 97.2  $\mu\text{m}$  のビーズを得た（誘導増強剤 6）。

## 【0081】

得られたビーズをメタノールで 3 回洗浄して、注射用生理食塩水で 5 回洗浄した。その後、かさ体積で 400  $\mu\text{L}$  を実施例 1 と同様にして滅菌済み 1.5 mL 用チューブに充填し、OK-432 が添加された血液を 1.1 mL チューブに添加したこと以外は実施例 1 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

## 【0082】

(実施例 27)

非研磨のビーズを用いた以外は実施例 26 と同様にして、Ra 値 0.186  $\mu\text{m}$  及び Sm 値 298.7  $\mu\text{m}$  の誘導増強剤 6 を作製した。実施例 26 と同様に、OK-432 が添加された血液と接触させ、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 7 に示した。

## 【0083】

(比較例 29)

誘導増強剤 6 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 26 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導

量を測定した。結果を表7に示した。

【0084】

(比較例30、31)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例26、27と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表7に示した。

【0085】

【表7】

	中心線平均粗さ Ra値( $\mu\text{m}$ )	凸凹平均間隔 Sm値( $\mu\text{m}$ )	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例26	1.36	97.2	0.1	288
実施例27	0.186	298.7	0.1	165
比較例29	—	—	0.1	84
比較例30	1.36	97.2	—	<10
比較例31	0.19	298.7	—	<10

【0086】

(実施例28~32)

誘導増強剤1(粒子状ポリスチレン系高分子材料、三菱化学社製、商品名:ダイヤイオンHP-50)、誘導増強剤2(粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番:アンバーライトXAD-2000)、誘導増強剤7(粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番:アンバーライトXAD-2)、誘導増強剤8(粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番:アンバーライトXAD-4)、又は、誘導増強剤9(粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番:アンバーライトXAD-16HP)を用いた以外は、実施例2と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表8に示した。

【0087】

(比較例32)

誘導増強剤を用いなかったこと、及び、OK-432が添加された血液のチューブへの添加量を1.5mLとしたことを除いては、実施例28と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表8に示した。

【0088】

(比較例33~37)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例28~32と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表8に示した。

【0089】

【表 8】

	誘導増強剤 かさ体積 (50 $\mu$ L)	材質	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 28	誘導増強剤 1	HP50	0.1	360
実施例 29	誘導増強剤 2	XAD2000	0.1	255
実施例 30	誘導増強剤 7	XAD2	0.1	238
実施例 31	誘導増強剤 8	XAD4	0.1	378
実施例 32	誘導増強剤 9	XAD16HP	0.1	205
比較例 32	なし	—	0.1	104
比較例 33	誘導増強剤 1	HP50	—	<10
比較例 34	誘導増強剤 2	XAD2000	—	<10
比較例 35	誘導増強剤 7	XAD2	—	<10
比較例 36	誘導増強剤 8	XAD4	—	<10
比較例 37	誘導増強剤 9	XAD16HP	—	<10

## 【0090】

(実施例 33~40)

誘導増強剤 10 (石油ピッチ系球状活性炭、比表面積 800 m<sup>2</sup>/g 以上、粒径 200~400  $\mu$ m、呉羽化学社製、商品名:クレメジン細粒 (慢性腎不全用剤))、誘導増強剤 11 (石油ピッチ系球状活性炭、比表面積 1100~1300 m<sup>2</sup>/g、粒径 400~800  $\mu$ m、呉羽化学社製、商品名: BAC-LP)、誘導増強剤 12 (フェノール樹脂系球状活性炭、比表面積 1000 m<sup>2</sup>/g 以上、粒径 150~300  $\mu$ m、カネボウ社製、商品名: ベルファイン AB)、誘導増強剤 13 (石油ピッチ系球状活性炭、比表面積 800~1200 m<sup>2</sup>/g、粒径 500~800  $\mu$ m、ジーエルサイエンス社製、商品名: アクティブカーボンビーズ)、誘導増強剤 14 (石炭系破碎状活性炭、比表面積 1000 m<sup>2</sup>/g 以上、径 400~1700  $\mu$ m、明和工業社製、商品名: CG1040)、誘導増強剤 15 (ヤシガラ系破碎状活性炭、比表面積 800 m<sup>2</sup>/g 以上、径 500~1800  $\mu$ m、ナカライテスク社製、商品名: ヤシガラ製活性炭素未洗浄処理品 8~32 メッシュ)、誘導増強剤 16 (フェノール樹脂系円柱状分子篩炭、比表面積 500 m<sup>2</sup>/g 以下、径 1000~4000  $\mu$ m、カネボウ社製、商品名: ベルファイン MG)、又は、誘導増強剤 17 (フェノール樹脂系円柱状造粒活性炭、比表面積 1500 m<sup>2</sup>/g 以上、径 1000~4000  $\mu$ m、カネボウ社製、商品名: ベルファイン BG) を用いた以外は、実施例 2 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。尚、径は短軸径及び長軸径を示す。

## 【0091】

(実施例 41~48)

誘導増強剤 10~17 をメノウ乳鉢を用いてすりつぶし、粒径 50  $\mu$ m 以下にして用いたことを除いては、それぞれ実施例 33~40 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0092】

(比較例 38)

誘導増強剤を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 33 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0093】

(比較例 39~46)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 33~40 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 9 に示した。

## 【0094】

【表9】

	誘導増強剤 かさ体積(50 $\mu$ L)	材質	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例33	誘導増強剤10	クレメジン細粒	0.1	526
実施例34	誘導増強剤11	BAC-LP	0.1	495
実施例35	誘導増強剤12	ベルファインAB	0.1	531
実施例36	誘導増強剤13	アクティブカーボンビーズ	0.1	488
実施例37	誘導増強剤14	CG1040	0.1	376
実施例38	誘導増強剤15	ヤシガラ製活性炭素	0.1	368
実施例39	誘導増強剤16	ベルファインMG	0.1	305
実施例40	誘導増強剤17	ベルファインBG	0.1	581
実施例41	誘導増強剤10	クレメジン細粒	0.1	230
実施例42	誘導増強剤11	BAC-LP	0.1	206
実施例43	誘導増強剤12	ベルファインAB	0.1	244
実施例44	誘導増強剤13	アクティブカーボンビーズ	0.1	222
実施例45	誘導増強剤14	CG1040	0.1	217
実施例46	誘導増強剤15	ヤシガラ製活性炭素	0.1	231
実施例47	誘導増強剤16	ベルファインMG	0.1	185
実施例48	誘導増強剤17	ベルファインBG	0.1	255
比較例38	—	—	0.1	104
比較例39	誘導増強剤10	クレメジン細粒	—	<10
比較例40	誘導増強剤11	BAC-LP	—	<10
比較例41	誘導増強剤12	ベルファインAB	—	<10
比較例42	誘導増強剤13	アクティブカーボンビーズ	—	<10
比較例43	誘導増強剤14	CG1040	—	<10
比較例44	誘導増強剤15	ヤシガラ製活性炭素	—	<10
比較例45	誘導増強剤16	ベルファインMG	—	<10
比較例46	誘導増強剤17	ベルファインBG	—	<10

## 【0095】

(実施例49)

ポリスチレン-ジビニルベンゼン共重合体の誘導増強剤8(粒子状ポリスチレン系高分子材料、オルガノ社製、品番:アンバーライトXAD-4)をかさ体積で1mLと、1KE/mLのOK-432(中外製薬社製、商品名:ピシバニール)と、0.1容積%ホルマリン(中性緩衝ホルマリン液、和光純薬工業社製)を含有する生理食塩水1mLとを混合し、37℃にて20時間、回転混和させてOK-432を誘導増強剤8の粒子表面に物理吸着させた。この後、この粒子を生理食塩水にて充分洗浄した後、かさ体積で100 $\mu$ Lを滅菌済みチューブ(ダイアマトロン社製、1.5mL用)に充填した。

血液にはOK-432を添加しなかったこと、及び、血液のチューブへの添加量を1.4mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表10に示した。

## 【0096】

(実施例50~55)

ホルマリン濃度(容積%)を表10に示した通りとしたことを除いては、実施例49と同様にし、IFN- $\gamma$ の誘導量を測定した。結果を表10に示した。

## 【0097】

(比較例 47)

OK-432 の物理吸着処理をしていない誘導増強剤 8 を使用したこと以外は、実施例 49 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 10 に示した。

【0098】

(比較例 48)

誘導増強剤 8 を用いなかったこと、及び、0.1 KE/mL の OK-432 が添加された血液 1.5 mL をチューブに添加したことを除いては、実施例 49 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 10 に示した。

【0099】

【表 10】

	誘導増強剤 8 かさ体積 (100 $\mu$ L)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 49	ホルマリン 0.1%	—	233
実施例 50	ホルマリン 0.5%	—	261
実施例 51	ホルマリン 1.0%	—	280
実施例 52	ホルマリン 2.0%	—	288
実施例 53	ホルマリン 3.0%	—	212
実施例 54	ホルマリン 5.0%	—	255
実施例 55	ホルマリン 10.0%	—	222
比較例 47	物理吸着なし	—	<10
比較例 48	—	0.1	96

【0100】

(実施例 56)

実施例 51 と同様にして作製した OK-432 を粒子表面に物理吸着させた誘導増強剤 8 を、かさ体積で 4 mL 血液バッグ (テルモ社製、分離バッグ 200 mL 用) に充填した。健康人から採血して得たヘパリン 15 IU/mL 含有の静脈血 50 mL をこの血液バッグに導入した。この血液バッグを 37℃ で 24 時間、穏やかに攪拌しながらインキュベートした。この血液中の IFN- $\gamma$  誘導量を実施例 1 と同様にして測定した。結果を表 11 に示した。

【0101】

(実施例 57、58)

誘導増強剤として誘導増強剤 10 又は誘導増強剤 17 を用いたこと、及び、生理食塩水としてホルマリンを含有しないものを用いたことを除いては、実施例 56 と同様にして、IFN- $\gamma$  の誘導量を測定した。結果を表 11 に示した。

【0102】

(比較例 49～51)

OK-432 の物理吸着処理をしていない誘導増強剤 8、誘導増強剤 10 又は誘導増強剤 17 を使用したこと以外は、それぞれ実施例 56～58 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 11 に示した。

【0103】

(比較例 52)

誘導増強剤 8 を用いなかったこと、及び、0.1 KE/mL の OK-432 が添加され

た血液 50 mL を血液バッグに導入したことを除いては実施例 56 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 11 に示した。

【0104】

【表 11】

	誘導増強剤8 かさ体積(4mL)	誘導増強剤10 かさ体積(4mL)	誘導増強剤17 かさ体積(4mL)	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例56	物理吸着	—	—	—	257
実施例57	—	物理吸着	—	—	377
実施例58	—	—	物理吸着	—	420
比較例49	物理吸着なし	—	—	—	<10
比較例50	—	物理吸着なし	—	—	<10
比較例51	—	—	物理吸着なし	—	<10
比較例52	—	—	—	0.1	98

【0105】

(実施例 59)

OK-432 を 0.01 KE/mL の濃度で用いたこと、及び、IL-10 を測定したこと以外は、実施例 2 と同様にして測定した。結果を表 12 に示した。

【0106】

(比較例 53)

誘導増強剤 1 を添加しなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 59 と同様にして、IL-10 誘導量を測定した。結果を表 12 に示した。

【0107】

(比較例 54)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 59 と同様にして、IL-10 誘導量を測定した。結果を表 12 に示した。

【0108】

【表 12】

	誘導増強剤1 かさ体積( $\mu$ L)	OK-432濃度 (KE/mL)	IL-10誘導量(pg/mL)		
			被採血者		
			A	B	C
実施例59	50	0.01	560	285	421
比較例53	—	0.01	74	39	112
比較例54	50	—	<10	<10	<10

【0109】

(実施例 60、61)

OK-432 の濃度を 0.01 KE/mL 及び 0.1 KE/mL の 2 用量にした以外は、実施例 2 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0110】

(実施例 62、63)

誘導増強剤として、誘導増強剤 10 を用いたこと、及び、OK-432 の濃度を 0.01 KE/mL 及び 0.1 KE/mL の 2 用量にした以外は実施例 2 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0111】

(比較例 55、56)

OK-432 を添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例 60、62 と同様にし

て、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0112】

(比較例 57、58)

誘導増強剤 1 を添加しなかったことと、OK-432 が添加された (0.01 KE/mL 又は 0.1 KE/mL) 血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、それぞれ実施例 60、61 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 13 に示した。

【0113】

【表 13】

	誘導増強剤 1 かさ体積 ( $\mu$ L)	誘導増強剤 10 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)		
				被採血者		
				A	B	C
実施例 60	50	—	0.01	79	355	128
実施例 61	50	—	0.1	267	466	432
実施例 62	—	50	0.01	145	394	249
実施例 63	—	50	0.1	385	665	512
比較例 55	50	—	—	<10	12	<10
比較例 56	—	50	—	<10	<10	<10
比較例 57	—	—	0.01	<10	94	59
比較例 58	—	—	0.1	84	176	89

## 【0114】

(実施例64)

誘導増強剤18としてナイロンウール（和光純薬工業社製）を0.04g（1.5mLチューブに充填したかさ体積として約300 $\mu$ L）用いたこと、及び、OK-432が添加された血液のチューブへの添加量を1.2mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表14に示した。

## 【0115】

(実施例65)

誘導増強剤19としてポリエステル不織布（日本バイリーン社製、商品名：EL-5600）を0.04g（1cm $\times$ 3cm、かさ体積として約300 $\mu$ L）用いたこと、及び、OK-432が添加された血液のチューブへの添加量を1.2mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表14に示した。

## 【0116】

(実施例66)

誘導増強剤20としてポリエステル不織布（日本バイリーン社製、品名：EW-7180）を0.04g（1cm $\times$ 3cm、かさ体積として約220 $\mu$ L）用いたこと、及び、OK-432が添加された血液のチューブへの添加量を1.28mLとしたことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表14に示した。

## 【0117】

(比較例59～61)

OK-432を血液に添加しなかったことを除いては、それぞれ実施例64～66と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表14に示した。

## 【0118】

(比較例62)

誘導増強剤を用いなかったこと、及び、OK-432が添加された血液（0.1KE/mL）のチューブへの添加量を1.5/mLとしたことを除いては、実施例64と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表14に示した。

## 【0119】

【表14】

	誘導増強剤	OK-432濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例64	誘導増強剤18	0.1	208
実施例65	誘導増強剤19	0.1	285
実施例66	誘導増強剤20	0.1	257
比較例59	誘導増強剤18	—	<10
比較例60	誘導増強剤19	—	<10
比較例61	誘導増強剤20	—	<10
比較例62	—	0.1	101

## 【0120】

(実施例67)

誘導増強剤21（ポリビニルアルコールゲル粒子、粒径約1mm）として、横井弘「PVA及びPAAの錯体ゲル」（高分子加工Vol. 40、No. 11、1991年）に従い、ポリビニルアルコール-Fe（III）錯体ゲル粒子を作製した。誘導増強剤21を生理食塩水に懸濁し、かさ体積で300 $\mu$ Lの誘導増強剤21を1.5mL用滅菌チューブに充填した。OK-432が添加された血液1.2mLをチューブに添加したことを除いては、実施例1と同様にして、IFN- $\gamma$ 誘導量を測定した。結果を表15に示した。

## 【0121】



(比較例 63)

OK-432 を血液に添加しなかったことを除いては、実施例 67 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 15 に示した。

【0122】

(比較例 64)

誘導増強剤 21 を用いなかったこと、及び、OK-432 が添加された血液のチューブへの添加量を 1.5 mL としたことを除いては、実施例 67 と同様にして、IFN- $\gamma$  誘導量を測定した。結果を表 15 に示した。

【0123】

【表 15】

	誘導増強剤 21 かさ体積 ( $\mu$ L)	OK-432 濃度 (KE/mL)	IFN- $\gamma$ 誘導量 (pg/mL)
実施例 67	300	0.1	266
比較例 63	300	—	<10
比較例 64	—	0.1	88

【産業上の利用可能性】

【0124】

本発明によれば、溶連菌及び／又は溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むので、相乗効果により、サイトカインを非常に効果的に誘導することができるサイトカイン誘導剤が提供され、また、本発明のサイトカイン誘導剤を使用したサイトカイン誘導用具は、特に血液バック状の容器やカラム状の容器とすることにより、サイトカインの誘導が有効である様々な疾患の治療に非常に有用なものである。

【図面の簡単な説明】

【0125】

【図 1】表面粗さを説明するための模式図であり、凸凹の「山」を説明するための図である。

【図 2】表面粗さにおける凸凹平均間隔  $S_m$  値を説明するための図である。

【図 3】本発明のサイトカイン誘導用具の一例を示す模式的断面図である。

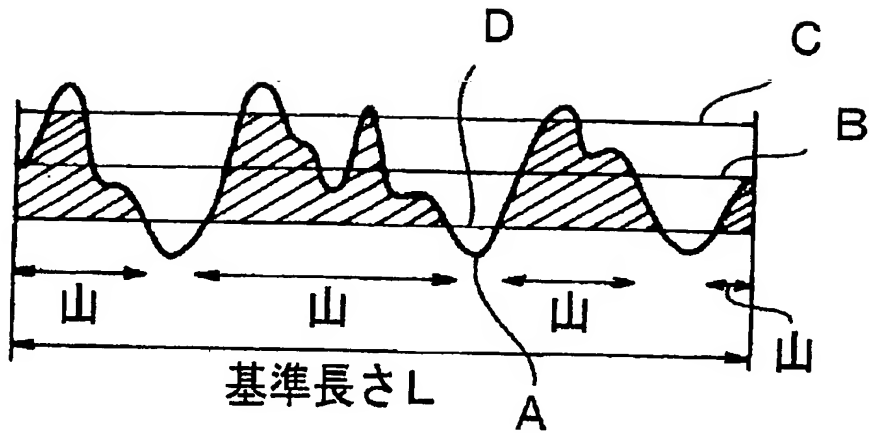
【符号の説明】

【0126】

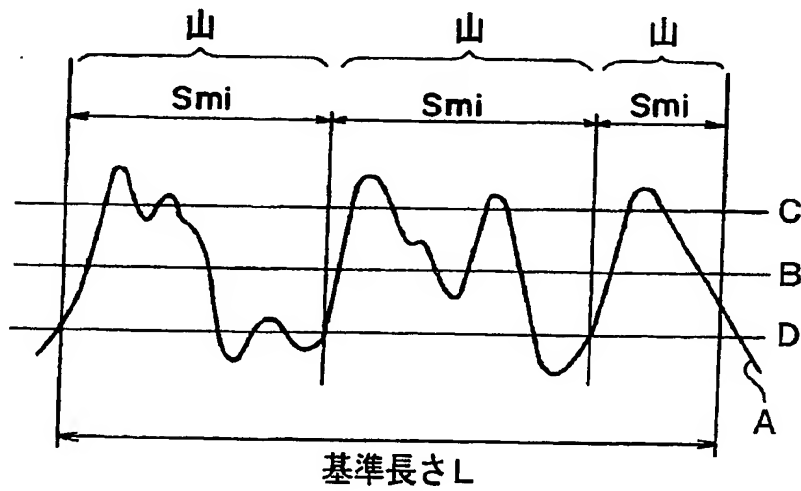
- 1 導入部
- 2 導出部
- 3 容器
- 4 サイトカイン誘導材料と接触した血液
- 5 サイトカイン誘導材料流出防止機構

【書類名】図面

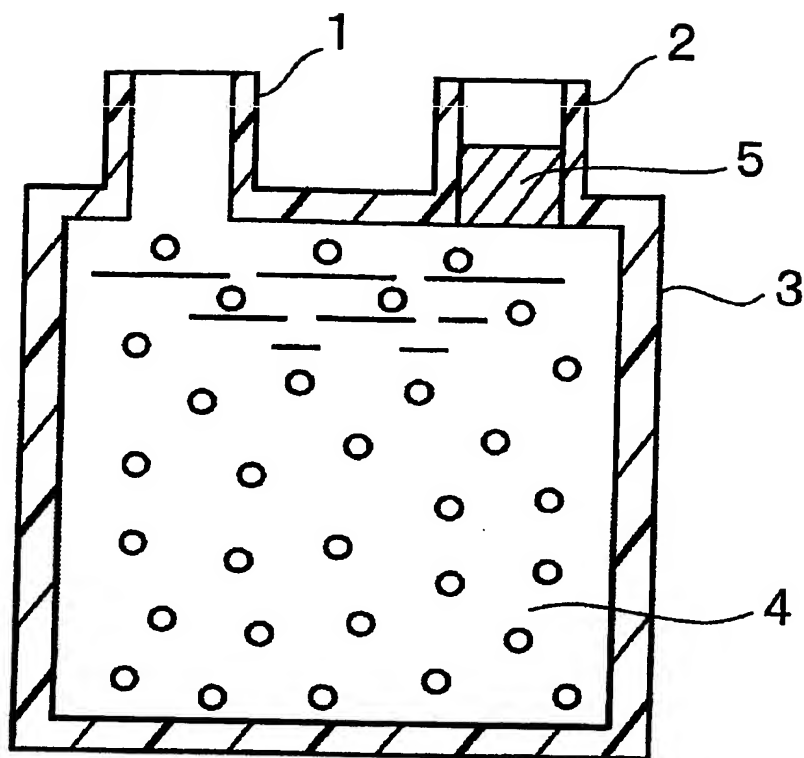
【図 1】



【図 2】



【図 3】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】 従来のサイトカイン誘導療法に比べてより効果的にサイトカインを誘導し得る新規なサイトカイン誘導材料及びサイトカイン誘導用具を提供する。

【解決手段】 溶連菌及び溶連菌由来成分と、水に不溶性の誘導増強剤とを含むサイトカイン誘導材料。

【選択図】 なし

特願 2003-276831

ページ: 1/E

出願人履歴情報

識別番号

[000002174]

1. 変更年月日  
[変更理由]

住所  
氏名

1990年 8月29日

新規登録

大阪府大阪市北区西天満2丁目4番4号  
積水化学工業株式会社

出証番号 出証特 2004-3048175